

Novel antibodies and methods for their use.

Publication number: JP6506827 (T)

Publication date: 1994-08-04

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: A61K39/395; A61K47/48; C07K16/46; C12M1/34; C12N5/10; C12N15/02; C12P21/08; G01N33/536; G01N33/542; G01N33/543; C12R1/91; A61K39/395; A61K47/48; C07K16/46; C12M1/34; C12N5/10; C12N15/02; C12P21/08; G01N33/536; G01N33/543; (IPC1-7): C12P21/08; A61K39/395; A61K47/48; C12M1/34; C12N5/20; C12N15/06; G01N33/536; C12N5/20; C12R1/91

- European: A61K47/48T4B46D; C07K16/46D; G01N33/542; G01N33/543B

Application number: JP19920508633T 19920424

Priority number(s): GB19910008954 19910426; GB19920007192 19920401; WO1992GB00769 19920424

Also published as:

JP3431140 (B2)

EP0511011 (A1)

EP0511011 (B1)

US5573920 (A)

NZ242510 (A)

more >>

Abstract not available for JP 6506827 (T)

Abstract of corresponding document: EP 0511011 (A1)

This invention relates to antibodies and is particularly, though not exclusively, concerned with diagnostic and therapeutic methods using monoclonal, bi- or tri-specific antibodies. The invention also provides a method in which binding of a first antigen to a first antibody antigen binding site cause release of a second antigen from an adjacent second antibody antigen binding site.

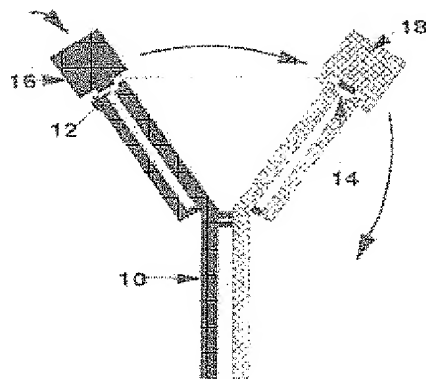


Figure 1

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-506827

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)8月4日

(51) Int. Cl. ⁵	識別符号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 21/08		8214-4B	
A 6 1 K 39/395	M	9284-4C	
47/48	Z	7433-4C	
		8412-4B	C 1 2 N 5/ 00
		9050-4B	15/ 00
			B
			C
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 10 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平4-506833
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)4月24日
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)10月26日
 (86) 国際出願番号 P C T / G B 9 2 / 0 0 7 6 9
 (87) 国際公開番号 W O 9 2 / 1 9 9 7 3
 (87) 国際公開日 平成4年(1992)11月12日
 (31) 優先権主張番号 9 1 0 8 9 5 4 , 0
 (32) 優先日 1991年4月26日
 (33) 優先権主張国 イギリス (G B)
 (31) 優先権主張番号 9 2 0 7 1 9 2 , 7
 (32) 優先日 1992年4月1日
 (33) 優先権主張国 イギリス (G B)

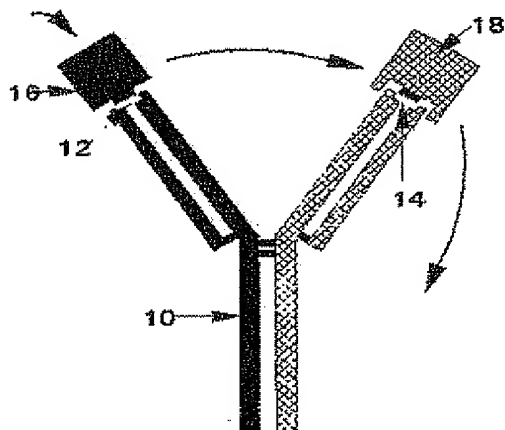
(71) 出願人 サーフィス・アクティブ・リミテッド
 イギリス国、エイボン、プリストル、ハー
 ベリー・ロード、ヘンリーズ・ハウス、ホ
 ウトン・ストーン (番地なし)
 (72) 発明者 ランドル、ベヴァリー・ジェーン
 イギリス国、ビーエス8・2 エックスエ
 ル、エイボン、プリストル、アッパー・ベ
 ルグレイブ・ロード 19
 (74) 代理人 弁理士 倉我 道照 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体およびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は抗体に関するものであり、かつ詳細には、これに制限されるものではないが、モノクローナル抗体、2 特異的抗体または 8 特異的抗体を使用した診断用および治療用の方法に関する。また、本発明は、第 1 の抗原の第一抗体抗原結合部位への結合が隣接する第二抗体抗原結合部位からの第 2 の抗原の放出を引き起こす方法も提供する。



特 表 の 要 約

1. 第1の抗原の第一抗原結合部位への結合が阻害する第二抗原抗体結合部位からの第2の抗原の放出を引起こす、試薬からの抗原放出方法。
2. 前記第一および第二抗原抗体結合部位が同一の抗体により提供される、請求項1に記載の方法。
3. 前記抗体が2特異的抗体、3特異的抗体または他の多特異的抗体である、請求項2に記載の方法。
4. 前記第一および第二抗原抗体結合部位がそれぞれ第1および第2の抗体により提供される、請求項1に記載の方法。
5. 在体内または試験管内で実施される診断用、治療用または美容用の方法である、請求項1〜4のいずれかひとつに記載の方法。
6. 前記第2の抗原が酵素または他の検出可能なマーカーである、請求項5に記載の方法。
7. 前記第2の抗原が治療用である、請求項5に記載の方法。
8. 前記第一および第二抗原抗体結合部位が、20 $\mu\text{e}/\text{ml}$ を超える蛋白濃度で表面に結合された、1つの抗体または第1および第2の抗体により形成される、請求項6に記載の方法。
9. 前記抗体が50〜100 $\mu\text{e}/\text{ml}$ の蛋白濃度で表面に結合されている、請求項5に記載の方法。
10. 前記表面がマイクロタイターレーのウェルの表面である、請求項5または9に記載の方法。
11. 前記第2の抗原が第二抗原抗体結合部位に不溶性な状態で結合しているかまたは該部位に結合することにより不溶性となり、かつ第1の抗原の第一抗原抗体結合部位への結合の際に不溶性な状態で放出される、請求項1〜10のいずれかひとつに記載の方法。

一方の薬剤前駆体が存在するとともに活性化となる薬剤前駆体である、請求項1〜17に記載の治療用の方法。

19. 第1および第2の酵素がそれぞれ第一および第二抗原結合部位から活性な状態で放出されるが、このとき、これら2つの放出される酵素は決まらう一方の酵素の存在で反対を触媒するものである、請求項1〜18に記載の方法。
20. 抗原および酵素に対する結合部位を有し、該酵素の抗体への結合は該酵素を不溶性とする多特異的抗体と抗原とを触媒させ、その前記抗原の該抗体への結合が該抗体からの前記酵素の活性な状態で放出をもたらし、ならびに該抗体中の前記抗原の存在を示す前記放出される酵素の活性を検出することを含む、試薬中の前記抗原の存在または不溶性を判定するための免疫検定方法。
21. 前記抗体が2特異的抗体である、請求項20に記載の方法。
22. 前記酵素がその活性部位により抗体と結合される、請求項20または21に記載の方法。
23. 前記抗原が酵素活性物質アブペプティンである、請求項20〜22のいずれかひとつに記載の方法。
24. 前記酵素が、 β -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、フラーゼ、脱酸素酵素、またはホスファタシユルホキシダーゼである、請求項20〜23のいずれかひとつに記載の方法。
25. 酵素が抗体への結合により不溶性とされ、そして抗原の抗体への結合の際に活性な状態で放出される、抗原および酵素に対する結合部位を有する多特異的抗体。
26. 前記多特異的抗体が2特異的抗体である、請求項25に記載の多特異的抗体。
27. 酵素活性物質アブペプティンおよび酵素に対する結合部位を有し、該酵素の抗体への結合が該酵素を不溶性とする多特異的抗体と抗原とを触媒させ、その前記抗原の該抗体への結合が該抗体からの前記酵素の活性な状態で放出をもたらし、ならびに該抗体中の酵素活性物質アブペプティンの存在を示す前記放出される酵素の活性を検出することを含む、哺乳動物細胞試料中の酵素活性物質アブペプティンを放出する方法。

12. 前記第2の抗原が酵素または他の治療用薬、診断薬または化粧品原料である、請求項11に記載の方法。

13. 前記第2の抗原の第二抗原結合部位からの放出を引き続き、該放出された第2の抗原または該第2の抗原の反応生成物の第三抗原結合部位への結合が起こり、それにより、該放出する第三抗原抗体結合部位からの抗原に結合していた第3の抗原の放出を引起こす、請求項1〜12に記載の方法。

14. 該診断マーカーおよび酵素または他の検出可能な診断用インジケータにそれぞれ対応する第一および第二抗原結合部位を有し、抗体への結合が該抗体または他の検出可能なマーカーを不溶性にする第1の抗体、該抗体または他の検出可能なマーカーあるいは該抗体または他の検出可能なマーカーの反応生成物、あるいはそれらにより触媒される反応の反応生成物に対する第一抗原抗体結合部位と前記または他の治療用薬に対する第二抗原結合部位を有する第2の抗体をそれぞれ含み、前記第1の抗体に対する前記診断マーカーの結合が、活性な状態で前記診断した酵素または他の検出可能な診断用マーカーの放出を引き起こし、そして、該酵素または他の検出可能な診断マーカーが該第2の抗体に結合して、結合した薬剤または他の治療用薬の該第2の抗体からの放出を引き起こす、請求項15に記載の方法に使用するためのキット。

15. 該診断マーカーに方向付けられた第一抗原結合部位、インジケータ酵素に方向付けられた第二抗原結合部位、および不溶性な状態で包まれる結合した薬剤または他の治療用薬を有する第三抗原結合部位を含む、請求項15の方法に使用するための3成分の試薬。

16. 該酵素または他の検出可能なマーカーである第1の抗体に方向付けられた第一抗原結合部位を有し、該抗体または他の治療用薬に方向付けられた第二抗原結合部位を有し、該第1の抗体の第一抗原結合部位への結合が第二抗原結合部位からの前記治療用薬の放出を引き起こす、多特異的抗体。

17. 前記薬剤または他の治療用薬が不溶性な状態で前記第二抗原結合部位に結合するか精微粒子に結合することによって不溶性な状態となる、請求項15〜16のいずれかひとつに記載のキットまたは多特異的抗体。

18. 1つの抗原結合部位から前記前駆体が放出され、そして別の部位からは別の薬剤前駆体が放出されるが、このとき、これらの前記前駆体は互いにもう

28. 前記抗体が2特異的抗体である、請求項27に記載の方法。

29. 前記酵素が β -ガラクトシダーゼである、請求項28に記載の方法。

30. SP-Aおよび酵素に対する結合部位を有し、該酵素の抗体への結合が該酵素を不溶性とし、SP-Aの該抗体への結合が該抗体からの前記酵素の活性な状態で放出をもたらし、請求項27〜29のいずれかひとつに記載の方法に使用するための多特異的抗体。

31. 前記抗体が、ブダベスト抗体の前駆体項に強い、変型、ボートンダウンの収縮特性を有するコレクションに属する抗体として特許されている抗体である、請求項27〜30のいずれかひとつに記載の方法または抗体。

32. 第一および第二抗原結合部位を有する前記抗体がバイオセンサの基面と結合される、請求項1〜32のいずれかひとつに記載の診断用の方法または免疫検定方法に使用するためのバイオセンサ。

33. 請求項16または17に記載の多特異的抗体ならびに該抗体に結合した薬剤または他の治療用薬を含むキット。

34. ブダベスト抗体の免疫前項に強い、変型、ボートンダウンの収縮特性を有するコレクションに属する抗体として特許されている抗体である、請求項30-19。

モノクローナル抗体技術により、特異的抗体が同定されつゝ、2種類の免疫グロブリンの列では、各々の2種類の抗体が特異性の異なる2つの抗原結合部位を有している。2種類の免疫球、それぞれ目的地 (incubator) 抗体に結合するモノクローナル抗体を分出する名々の異なるハイブリドーマを融合して、【題に「ポリドーマ (polydome)」と称される】。1. 1つの免疫グロブリンドーマを「ヒューゼーマ (Jesoma)」を形成することにより製造され得る (Songcipsila, S and Zechmann F.J., 1989) (Clin Exp Immunol 78, 815 and Suresh HK et al (1995) Proc. Natl Acad Sci USA 92, 7969 and G 2309212). 細胞ハイブリドーマは抗体産生と分泌された抗体同様に抗原刺激の導入により取り除くことができる (De Lau et al (1985) J. Immunol Methods 137, 7). 動物に製造された抗体

第2に肝臓結合部位からの排泄の形式は、放出された抗原、例えば、炭素または肝の結核分干の、あるいは存在するならばその反応生成物の1つ、例えば、放出された抗原により結核分干が抗原の反応生成物の、解離する機体上の第三部位における結合を誘導することができ、それにより、破壊する第四抗原結合部位からの第三の結合抗原の放出を引起こすことができる。

本発明の1つの態様によれば、ある抗原が1つの免疫反応誘発剤に結合する
ことが、前記する第二抗体抗原結合部位からその抗原の発現を阻害する方が
提議される。母物はよって導出されることが、前記の抗原と反応していた
抗原との間の免疫応答が、結合している抗原の第二抗体抗原結合部位からの放
出を阻害することであると本発明者らは確信している。第一および第二抗体抗原
結合部位は、同一の多糖質鎖(multisaccharide)鎖体または電荷に等質する別
の抗体により誘発されることができる。「多糖質鎖」という用語は、糖質鎖時

人工天面緑地物質環境総量の智慧の経路。即環境の状況の反映はSP-Aの状況により特徴付けられる。

異なる抗体からの2つの異なる結合分子の放出は、双方の放出分子が存在するときのみ起こる反応を要することができ、抗原生成後は、抗原の形成を誘発する別の抗体と結合することができる。該抗原とは、例えば、その抗体に結合した治療用または診断用分子等である。治療用途において、両方の抗原前駆体が存在するときに活性薬剤形態をとり、そのときにその治療のために活性となる2つの抗原前駆体が放出されることができ、例えば腫瘍の治療において、第1の2特異的抗体は、多くの腫瘍腫瘍のインジケータである即発腫瘍抗原アブタン (S-P-A) に対して方向付けられた第一抗原結合部位、および腫瘍前駆体Aに対して方向付けられた第二抗原結合部位と有する。第2の2特異的抗体は、急速な腫瘍生長のインジケータであるトランスフェリン受容体に對して方向付けられた第一抗原結合部位、および腫瘍前駆体B、即ち腫瘍前駆体Bに対して方向付けられた第二結合部位を有しているが、腫瘍前駆体AとBは結合して活性な抗原複合体となる。結合された両前駆体AとBを有する2つの抗体を含むカクテルを腫瘍患者の治療に使用すれば、S-P-Aとトランスフェリン受容体の存在下に腫瘍前駆体AとBを放出して活性な抗原複合体を形成させることが可能であろう。診断用途においては、2つの異なる診断用抗原の前駆体カスケード腫瘍抗原を誘発し、放出可能な診断用インジケータを生成させる。例えば、インヒビンのみと各それぞれに特異的な第一抗原結合部位、およびホースラディッシュペルオキシダーゼとグルコースオキシダーゼそれぞれに特異的な第二抗原結合部位を有する2つの特異的抗体が使用されることができ、インヒビンの六価と各結合部位にカクテルはグルコースオキシダーゼにより放出されて過酸化水素を生成し、次にこの過酸化水素は、オルトフェニレンジアミンの容易に検出可能な高濃度増強と同時に、ペルオキシダーゼにより増強される。検出結果が得られる前に2つの異なる抗原部位が放出されればならぬ結果の抗原情報増強と同様、検出結果が得られる。

第一および第二抗原結合部位は、(i) 免疫検定において容易に検出を容易にするための、特に20 ng/ml、若しくは50 ng/mlを超えて高濃度の2種類のモノクローナル抗体の混合物、(ii) 2特異的抗体に結合して、モノクローナル抗体を送るヒューズマ、および(iii) 異なる抗原に対する結合部位を有し、相関に誘発されるか、または化学的修飾により生成された2特異的抗体

により、提供され得る。前記事象(i)は細胞内形質導入であると考えられ、同時に前記(ii)は細胞内形質導入であると考えられる。前記事象(iii)は細胞内および細胞内の形質導入を含んでいる。

おぼろげのモノクローナル抗体は、2種類の平均存在するモノクローナル抗体の混合物、または単一の2特異的抗体の確率的な混合物、例えば、遺伝子または遺伝子を用いたアフィニティクロマトグラフィーあるいはイオン交換またはゲル浸透による分離された免疫グロブリンを分離するための処理により、任意的に生成され得る。

モノクローナル抗体の製造には、均質に精製された2特異的または3特異的免疫グロブリンを必要とする。均質とする為の精製は、それぞれの抗原部位がそれに対して方向付けられた機知性マトリックスを用いた、シーケンシャルアフィニティクロマトグラフィー工程により達成されることができ、従って、多特異的抗体は、不純化した後、治療用または診断用分子を使用したクロマトグラフィーまたはイオン交換により精製される。

腫瘍治療の目的をアフィニティクロマトグラフィーは、均質にする前の溶液中に不純化抗体が多特異的抗体のイデオタイプ抗原決定基を保持する、不純化した抗イデオタイプ抗体マトリックスを使用することで達成される。

本発明の他の特徴によれば、該抗体における抗原の存在または不在を決定するための免疫検定方法が提供されるが、その方法は、抗原が抗体に結合する割合を測定し、該抗体の抗体への結合が該抗体を不活性にする多特異的抗体と抗体とを接触させ、その際前記抗原の抗体への結合が結合していた前記抗原の過剰な形態での抗体からの放出をもたらすこと、ならびに該抗体中の抗体の存在を示す放出された活性抗原の量を測定することを含む。従って、本発明のこの特徴は、免疫工程を含む簡単な免疫検定方法を提供する。

結論による裏付けを望むものではないが、本発明者は、新たに結合した抗原と結合していた抗体との間の立体障害が、抗体からの抗原の放出を引き起こすと信じている。従って、腫瘍は、目的抗原と抗体の立体障害を助長するように、非固形的にはそのサイズに差をつけて選択される。使用される抗体は、完全に抗原に結合して、抗原が抗原の存在下に結合を解くことがないようにするべきである。腫瘍は、その活性部位で抗体と結合することが望ましい。

例えば、その欠陥が早期の末期に起こる可成り腫瘍抗原のリスクのインジケータとなるS-P-A [Nathan et al. (1988) *Am J Obs Gynecol* 158: 155] が既述であってもよい。この抗原は全期生存の3%を占め、そして生後2週間以内の発症率の死に至る最も一般的な原因である。

腫瘍は、例えば、全ての腫瘍が十分に発症し、かつ容易に検出可能な腫瘍である。α-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、尿酸脱水素酵素またはホースラディッシュペルオキシダーゼであることができる。

本発明の他の特徴によれば、腫瘍が抗体への結合により不活性となり、そして抗原の抗体への結合の際に活性な形態で腫瘍から放出される。前記と腫瘍に対する結合部位を有する多特異的抗体が提供される。この抗体は2特異的抗体であることが望ましい。

本発明の他の特徴によれば、S-P-Aおよび腫瘍に対する結合部位を有し、腫瘍の前への結合は腫瘍を不活性にする多特異的抗体と抗体とを接触させ、その際S-P-Aの抗体への結合が結合していた抗原の過剰な形態での抗体からの放出をもたらすこと、ならびに該抗体中のS-P-Aの存在を示す放出された活性抗原の存在を検出することを含む。哺乳動物腫瘍細胞中のS-P-Aの検出方法が提供される。この方法は、α-ガラクトシダーゼであることができる。

本発明の他の特徴によれば、腫瘍および第1の腫瘍に対する結合部位を有し、腫瘍1の腫瘍の抗原生成物が該腫瘍中の抗原の存在を示す容易に検出可能な反応性腫瘍1を第2の抗体の第2の腫瘍の第2の腫瘍の高濃度として作用する。第1の2特異的抗体に結合を解かせることを含む、該抗体中の抗原の存在または不活性を決定するための免疫検定方法が提供される。前記第1の腫瘍はグルコースオキシダーゼであることができる。また、前記第2の腫瘍はホースラディッシュペルオキシダーゼであることができる。

本発明による診断方法は、多特異的抗体がバイオセンサの生物学的要素 (sensing element) として動くバイオセンサにおいて実施されるために予め準備されることができ、現在までに、モノクローナル抗体を電極バイオセンサに用いて、ヒトβナドトロピン [Robinson et al. (1987) *Biosensors* 6: 147] および食品中のスチロフィロコッカス・アウレウス [Staphylococcus aureus] [Mishra et al. (1988) *J. Appl. Bacteriol* 65: 577] が検

出されている。しかし、検出用抗体は抗体抗体抗原の免疫前に洗浄によって除去されようにならないことおよび腫瘍の発生にも問題があることから、一般的に検定は不可能であると証明されている。本発明の方法は、免疫前 (integrated enzyme) を使用するので、2特異的抗体は電極および平準化電極に直接組み込まれることができる。例えば、酵素電極またはイオン感応性電極効果トランジスタ (ISFET) はグルコースオキシダーゼと結合した2特異的抗体を含むことができる。あるいは、酵素電極または化学的電極効果トランジスタ (CHEM-FET) はウレアーゼと結合した2特異的抗体を含むことができる。

腫瘍および本発明の方法に用いられる多特異的抗体の調製の例を下記に記述するが、これらは単に例示のためのものにすぎない。

α-ガラクトシダーゼは充分に洗浄が行われており、そしてその反応は容易に検出される。

グルコースオキシダーゼはアスパーギルス・ニゲル (*Aspergillus niger*) から容易に分離され、1.86 kDの分子量を有する。グルコースオキシダーゼはモノクローナル抗体を含む物質であるので、抗体活性を保持したままモノクローナル抗体を用いて交差反応させて、結合不活性な腫瘍の抗原決定基を増加させることができる [Kosovic et al. (1987) *Appl. Biochem. Biotechnol* 15: 205]。グルコースオキシダーゼ抗体のサイズは化学修飾により調節することができる。グルコースオキシダーゼは、酵素電極の酵素成分として増強される。

クサナグマメから容易に分離され得るウレアーゼは、分子量590 kDの分子量 (hexameric) 蛋白質であり、96 kDのサブユニットが1つの活性部位を備えている。ウレアーゼは酵素電極における酵素成分として使用される。

尿酸脱水素酵素は二酸化炭素の形成および尿酸脱水素からの尿酸を触媒し、そしてモノクローナル抗体は尿酸は分離され得る。

ホースラディッシュペルオキシダーゼは充分に洗浄が行われた後、結合部位を有する [Khar et al. (1988) *J. Biol. Chem* 263: 6868]。ホースラディッシュペルオキシダーゼは、グルコースオキシダーゼにより生成されたホースラディッシュペルオキシダーゼの基質として使用する過酸化水素による酵素カスケードを生成させるために、グルコースオキシダーゼを第一部位に、かつホースラディッシュ

バルカシグーゼを第二部位に備えた。2つの部位による免疫検定方法 (two site immunassay method) に用いることができる。

以下に、本発明による抗体の調製およびそれらの使用方法を、単なる例示である限り用いて説明する。まず、図面を簡単に説明する。

図1は、本発明による抗体の調製を説明している。

図2は、本発明による抗体の使用を説明している。

図3は、本発明による抗体から放出された酵素の活性を説明しているグラフである。

図4は、本発明による抗体から放出された酵素の活性を説明しているグラフである。

図5は、本発明による抗体から放出された酵素の活性を説明しているグラフである。

図1に示される免疫グロブリンの型の2種類の抗体は、第1の抗原1および第2の抗原1との場合にそれぞれ異なる第一結合部位12と第二結合部位14を含む。第1の抗原1との第一結合部位12への結合は、結合していた第2の抗原1の第二結合部位14からの放出を引き起こす。

図2(1)に示される診断用途において、2種類の抗体20は、目的物の分析物26、例えばBPA、ならびに容易に検出可能な酵素標識抗体を有する酵素28、例えばβ-ガラクトシダーゼにそれぞれ方向付けられた第一抗原結合部位22と第二抗原結合部位24を有する。この酵素28は、第二結合部位24で抗体に結合しているときには、例えばその活性阻害または活性阻害近傍での結合。あるいは抗体部位の立体構造の変化による結合により、不活性化されている。

試料から第一結合部位22への分析物26の結合は、前記分析物26の存在を示す酵素28の活性が容易に検出される酵素中への、結合していた酵素28の放出を引き起こす。

図2(1)で説明される診断用途において、2種類の抗体20は、抗原の表面の抗原30および酵素標識抗体28にそれぞれ方向付けられた第一および第二結合部位32、34を有している。前記抗体20は、第二結合部位34で抗体に結合しているときには不活性化されている。前記抗体20の第一結合部位32への結合は、抗体20を免疫する細胞に対して作用し得る活性形態での結合を誘発する。

メトトレキサートを、抗原(酵素)標識の抗体の免疫原性を増強させるために自由アルブミンと結合する。免疫化のために、抗原の標識で、あるいは免疫原性を強化するためにキープホルリンペクトヘモシアニンの複合体として、酵素を使用する。

免疫したBALB/cマウスの腹腔腔を監視し、そして適切な反応の世代において免疫マウス由来の脾臓細胞をマウスのSP2/O細胞株細胞に融合させる。このことにより、ハイブリドーマを調製する。まず最初に、ハイブリドーマを、選択的抗体またはメトトレキサート複合体に対して、酵素結合免疫吸着法(ELISA)によりスクリーニングする。次に、酵素に対する抗体を分泌するクロニ化ハイブリドーマにより生成されるモノクローナル抗体を、酵素結合免疫吸着法をブロックする能力でスクリーニングする。そのような反応をブロックする能力を有するモノクローナル抗体は、酵素の活性阻害またはその近傍で結合することによりそのように働くものと考えられる。メトトレキサート反応性抗体を、メトトレキサートの細胞毒性効果をブロックする能力でスクリーニングする。次に、適切なモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを免疫培養で培養して、ヒューマニゼーションに適した選択的クローンを分離する。

ヒューマニゼーションに適切な選択的クローンを分離するために、2つの選択可能なマウスを調製する。5 mg/ml の6-チオチオグアニンの存在下にハイブリドーマを培養し、ヒポメチンチオグアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損株を生成する。

チオチオグアニン耐性を誘導するために、4×10⁶個のハイブリドーマ細胞を6×4×6ウエルの組織培養用培養瓶に100μlずつに分けて調製したが、これらのウエル内には10% (v/v) 熱不溶性ウエル底液(FCS)を含むアルファM124細胞[Stanners CP, Eficer G and Green H 1971, Nature, New Biol 232, 523, J 774マウスマウス細胞系からの20% (v/v) 培養液[Capecer Research 1977 32, 549]、および5 mg/ml の6-チオチオグアニン(Sigma #4600)が含まれていた。経路3週間後、選択的クローンのクローンを調製された。クローンをピッキングによりウエルから取り出し、そして選択培養した。抗体の分泌を監視し、分泌産物を調製した。次にこれらの産物を、免疫HAT直接システム(Life/Celltech J.R. (1964) Science 147, 709)により選択する。

3日の放出を引き起こす。

図2(1)に示される診断および治療を組み合わせた用途においては、2つの異なる2種類の抗体40、42が使用される。抗体40は細胞膜に結合する抗原44および不溶性な酵素で結合する酵素46に対する特異性を有している。抗体42は、酵素標識48ならびに酵素46または酵素標識の反応生成物に対する特異性を有している。前記抗体44の抗体40への結合は、酵素形態での酵素標識46の放出を引き起こす。この放出された酵素の活性は容易に検出される。次に、前記酵素46またはその反応生成物の1つが第二の抗体42に結合し、それにより抗体48の放出を引き起こして抗体44を免疫する細胞を誘発する。

2種類の抗体はハイブリドーマ細胞融合技術により簡単に調製することができる。最初に、適切なモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を分離し、そして活性付けられる。次に、免疫細胞が酵素の活性阻害における抗原による選択的活性を表現せられる。これらの選択的クローンは、次いで、異なる両細胞性の細胞融合の開始。あるいは選択的ハイブリドーマと免疫マウス由来の細胞融合との間の細胞融合による2種類の抗体生産に使用される。細胞融合および選択の位。産物は酵素の反応性を有する抗体生産のためにスクリーニングされる。選択された産物はクローン化され、そして免疫細胞により、このヒューマニゼーションによる2種類の免疫グロブリンの分泌が確認される。

本発明の使用において、分泌される免疫グロブリンはモノクローナル抗体として、分泌される免疫グロブリンにより調製される。次いで、分泌された抗体がシーケンシャルフィニッシュングプロセスで工程に送られて、均質な2種類の免疫グロブリンが分離される。

2種類の抗体の調製

A) 選択的モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製

2種類の抗体はヒューマニゼーション技術により簡単に調製される。

最初に、モノクローナル抗体を分泌する細胞系を、目的抗原および細胞毒性薬剤メトトレキサートに対して分離する。

両細胞性細胞または、哺乳動物細胞のナトリウム-カリウム ATPアーゼを阻害する阻害剤であるウアバイン(urabain)の濃度を増加させた培養における増殖により選択する。ウアバインの存在下では新生細胞は死亡するが、両細胞性は150-fold (fold) を超える両細胞性で生存することができる[Bankovitz R et al (1974) Cell 3, 221]。

ウアバイン耐性を誘導するために、2×10⁶個のハイブリドーマを培養し、そしてアルファM124、10% (v/v) FCSを含む1×10⁶から0.5×10⁶まで増加させた濃度のウアバイン(Sigma 49178)を含む培養で選択培養した。

2種類の細胞(両ウアバインおよびチオグアニン)耐性を誘導するために、上記と同様に増殖させた選択ウアバイン中で細胞を培養させた。0.5 mg/ml ウアバイン培養中での生存が可能となった細胞に、上記と同様に6-チオチオグアニンに対する選択耐性を誘導した。

6-チオチオグアニンおよびウアバインに対する耐性を有するハイブリドーマを、ヒューマニゼーションのためにクローニングした。

B) ヒューマニゼーション

一連の細胞融合系における免疫誘導により、2種類の抗体を分泌するヒューマニゼーション細胞、酵素反応性結合(enzyme-reactive)および目的抗原を認識する第二結合部位を有する2種類の抗体を分泌するヒューマニゼーション細胞を調製する。免疫マウスの脾臓細胞またはハイブリドーマである“酵素反応性細胞”および“抗原反応性細胞”から調製する。抗原反応性細胞の調製は、4×10⁶個の自由アルブミンを認識する抗体1×10⁶から0.5×10⁶のキープホルリンペクトヘモシアニンを調製する抗体R111、ならびに抗原にヒト和面免疫物質アボビン(A SP-A)と反応する抗体44およびE8 [Rendle 8] 111 (1992) 第10号] を生成する細胞を含む。抗体55は、クロキアの論文[Harokis Y et al. J Biol Chem 1986 261: 29-33]に記載された抗体P111に類似しているものと考えられている。下記に示す3つの実験により細胞融合反応を調製する。

表 6-506827 (ア)

0から100 mg/ml の増加した濃度のβ-ガラクトシダーゼを50 μl ずつ試管に添加し、室温にて1時間インキュベートした。0.5% (v/v) ツイーン20を含むPBS 200 μl を添加してウェルを2回洗浄し、そして結合β-ガラクトシダーゼを酵素阻害剤である“β-ガラクトシダーゼ阻害剤”の添加により検出した。この阻害剤は、通常に添加しながら0.1% リン酸緩衝液 (pH 7.3) 1 ml に溶解した0-ニトロフェニル β-D-ガラクトピロノシド (Sigma H-1127; ONPG) 20.5 mg を含む、ONPG溶液 83.2 μl をリン酸緩衝液 5 ml に添加したが、この阻害剤は、ウシ血清アルブミン (BSA) と塩化マグネシウムを下記の割合:

2.7 ml 0.1 M pH 7.5 リン酸緩衝液:

0.5% (v/v) BSA を含む 0.1 ml 0.03 M 塩化マグネシウム、で希釈して、10倍希釈方式において、GAL30.19は、最小限1 ml 当たり5 μg のβ-ガラクトシダーゼを抽出した。

SP-A 抽出液:

5~100 μg/ml の濃度のSP-Aを50 μl ずつ試管に、室温にて1時間インキュベートした。ウェルをツイーン20を含むPBSで2回洗浄し、そして結合したSP-Aを、PBS中の1.5% 2-ビオチンウエルを50 μl の添加により抽出した。2-ビオチンウエルは、D4と異なり、SP-Aの第二エポキシドと反応するモノクローナル抗体を分泌する [Band et al. 1992 参照]。E3免疫グロブリンは、免疫グロブリンまたは3-ビオチン分子の割合で置換される [野崎 et al. 1997]。ウェルをツイーン20を含むPBSで3回洗浄し、そして次にウェルを4℃で30分間、PBS中の1:500アビジン-アルカリホスファターゼ 50 μl とインキュベートした (PBS中に1 ml 当たり1 mg 野崎 et al. 1997)。ウェルをツイーン20を含むPBSで3回洗浄し、そして次にアルカリホスファターゼの底物を、塩基性、pH 9.5の4-ニトロフェニル ホスファートの水和物、2-ナトリウム (Sigma 94-105E) への添加により検出した。溶液に説明すれば、ウェル当たり50 μl の底物、即ち“アルカリ

ホスファターゼ底物”を1 M ジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.8) 1 ml 当たり1 mg で添加した。アルカリホスファターゼ阻害剤は、ジエタノールアミン 97 ml、水 860 μl、塩化マグネシウム水和物 100 mg からなる10% (v/v) ジエタノールアミン緩衝液を金でいた。1 M 阻害剤は、pH が9.8となるまで添加し、次に水を添加してその体積を1リットルとした。使用するまで4℃の条件下で貯蔵した。酵素による底物変換は、430 nm における光密度の測定により検出した。この読取標準方式を用いたときに、GAL30.19は最小限6.25 μg/ml のSP-Aを抽出することができた。

GAL30.19によるβ-ガラクトシダーゼ活性のブロック

1 μg/ml の濃度のGAL30.19免疫グロブリン 50 μl をβ-ガラクトシダーゼの底物を50 μl に添加して500 μg/ml の濃度とした。これにβ-ガラクトシダーゼ底物 100 μl を添加して430 nm における光密度で底物変換を監視した。抗体阻害の代わりにPBS 50 μl を用いた対照実験も平行して実施した。30分間後、試験試料中の酵素生成物の光密度は、抗体の存在下では0.920、そしてGAL30.19の存在下では0.597であった。このことから、GAL30.19がβ-ガラクトシダーゼの酵素活性をブロックすることを暗示している。

免疫化のための2倍量のGAL30.19免疫グロブリンの検出

物質を2倍量の免疫グロブリンを、シーケンシャルアフィニティクロマトグラフィーにより過剰抗体から分離した。過剰抗体はシーケンシャルアフィニティクロマトグラフィーであった。第一洗脱液は免疫グロブリンを、第二洗脱液はP-Aを含むビードマトリックスを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより分離した。溶液は通常的に1 M ジエタノールアミン (pH 11) を用いて行い、そして両分は1 M トリス塩 (pH 8) に中和した。中和した両分をG25セフアデックス (Pharmacia) 用いてPBSに透析後、凍結して“免疫”した。この段階で次に、β-ガラクトシダーゼを阻害するビードマトリックスをグルマ

トリックスが保持しているクロマトグラフィーを用いた第二のアフィニティクロマトグラフィー工程に供した。DEAE層析を最終し、物質を2倍量の底物と反応し、そして0.02% ツイーン20を含むPBS中に、洗脱時に4℃にて貯蔵した。クロマトグラフィーの完了時には、免疫グロブリン 2.7 mg から得られた免疫グロブリン 0.38 mg が得られた。最も濃縮された部分の抗体活性はβ-ガラクトシダーゼに対しては1:100、SP-Aに対しては1:100であった。GAL30.19の100%以上は、前記物質を底物の免疫条件下における10% (w/v) のSP-Aを電解液に添加により阻害した。

免疫化介体形成物質の明示

物質導入法は、免疫アフィニティクロマトグラフィーにより分離された濃度のGAL30.19免疫グロブリンと、SP-Aセファロースおよびβ-ガラクトシダーゼセファロースによるシーケンシャルアフィニティクロマトグラフィーにより過剰抗体から免疫化して分離した免疫グロブリンとの成分により明示された。

実験例 1. 濃縮免疫グロブリン検出 (図 3 参照)

ELISA コーティング溶液である濃縮免疫グロブリン (pH 9.8) をウェル当たり50 μl 用い、濃縮1 ml 当たり50 μl で、濃縮GAL30.19免疫グロブリンを4℃にて一夜インキュベートして底物表面をコーティングした。10% (v/v) PBSを含むPBSをウェル当たり100 μl 用いて、底物を完全に2回洗浄した。次に、ウェルを、0.5% (w/v) のBSA (Sigma A7588) を含むPBS洗脱液1 ml 当たり20 μg のβ-ガラクトシダーゼを含む底物 50 μl と室温で1時間インキュベートした。次に、ウェルを、0.5% (v/v) ツイーン20を含むPBS 200 μl で2回洗浄し、不飽和した免疫グロブリン抗体から結合した底物を取り除いた。

次に、洗脱液で希釈した、0.25~100 μg/ml の増加した濃度の、特定の免疫SP-A、分子量800 kD (ダルトン) の非特異的抗原K L Hを50 μl

が分子量1000 kD の非特異的抗原 K L Hであるマウス免疫グロブリンと、50 μl 希釈してウェルに供した。15分間後にその上層を取り出して、β-ガラクトシダーゼ底物溶液により、検出液からの酵素の抽出を評価した。底物50 μl 底物をβ-ガラクトシダーゼ底物溶液 50 μl とインキュベートした。底物から生成物への変換は、解凍上層中に抽出された酵素の存在を示す430 nm における光密度により測定した。物質導入法は、免疫アフィニティクロマトグラフィーにより分離された濃度のGAL30.19免疫グロブリンと、SP-Aセファロースおよびβ-ガラクトシダーゼセファロースによるシーケンシャルアフィニティクロマトグラフィーにより過剰抗体から免疫化して分離した免疫グロブリンとの成分により明示された。

実験例 2. 濃縮免疫グロブリン検出

特定の抗原の存在下、酵素の抽出が明示された (図 4 参照)。

ELISA コーティング溶液である濃縮免疫グロブリン (pH 9.8) をウェル当たり50 μl 用い、濃縮1 ml 当たり50 μl で、濃縮GAL30.19免疫グロブリンを4℃にて一夜インキュベートして底物表面をコーティングした。洗脱液を、10% (v/v) PBSを含むPBSをウェル当たり100 μl 用いて底物を2回洗浄した。次に、ウェルを、0.5% (w/v) のBSA (Sigma A7588) を含むPBS洗脱液1 ml 当たり20 μg のβ-ガラクトシダーゼを含む底物 50 μl と室温で1時間インキュベートした。そして、ウェルをツイーン20を含むPBSで2回洗浄し、不飽和した免疫グロブリン抗体から取り除いた。

次に、洗脱液で希釈した、0.25~100 μg/ml の増加した濃度の特定の免疫SP-AおよびSP-Aによる低分子量の非特異的抗原K L Hを50 μl 希釈してウェルに供した。15分間後、上層を取り出して、β-

ガラクトレジー産物産生により細胞融合体からの抗原放出を評価した。

高濃に投与すれば、抗原50 μ lをB-ガラクトレジー産物産生液50 μ lとインキュベートした。産物から生成物への変換は、非肥上膜中の抗原の存在を調べる。410nmにおける光学濃度により測定した。産物産生融合体から抗原が十分に放出されたのは、特異的抗原SP-Aの存在下においてのみであり、よく似た分子量の抗原KLFの存在下では十分に放出されなかった。

図3例3。特異的抗原産生融合体を用いた1工程免疫介体信号抗原導入法 (図5参照)

抗原導入抗体融合体を前記の如く調製し、ツイーン20を含むPBSによる2回の洗浄により培養液から非結合B-ガラクトレジー産物を洗い流した。次に、特異的抗原産生融合体と同時に抗原を、下記の通り調製した。

抗原産生融合体1ml当たり6.25 \times 10⁶個に希釈した。希釈した抗原の特異的抗原SP-Aおよび非特異的抗原KLFを50 μ lずつ調製し、B-ガラクトレジー産物産生液50 μ lと混合した。次に、抗原とB-ガラクトレジー産物の混合液100 μ lを、不活化した抗原導入抗体融合体を含むセルに添加した。抗原産生融合体からのB-ガラクトレジー産物の放出による抗原産生と、融合体に付着した抗原産生融合体により生じる色の410nmにおける光学濃度により測定した。

生成物産生は、抗原産生融合体(0 μ l)とその10分間隔(10 μ l)に測定した。その両方の場合において、GAL30により誘導される特異的抗原SP-Aの存在のみが、充分な生成物形成をもたらした。この結果は、GAL30.19の特異的な抗原産生融合体に対する抗原産生が、不活性化融合体の抗原産生可能な特異的B-ガラクトレジーへの抗原導入により1工程免疫介体信号抗原導入法をもたらしたことを明確に示している。

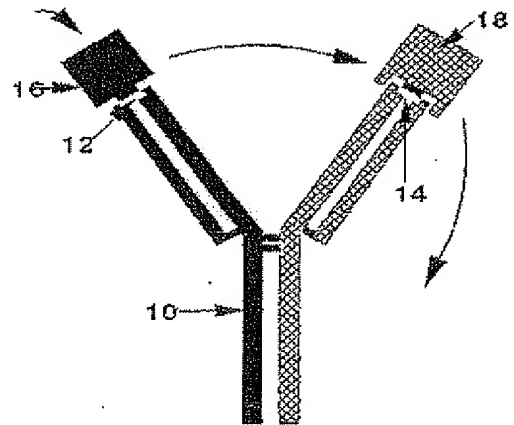


Figure 1

Figure 2

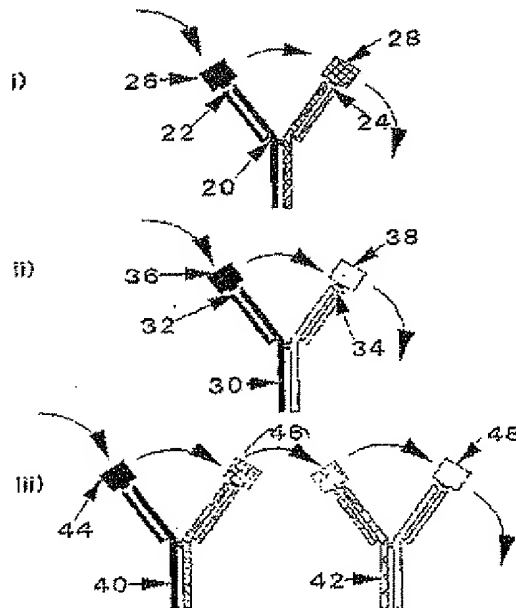


Figure 3

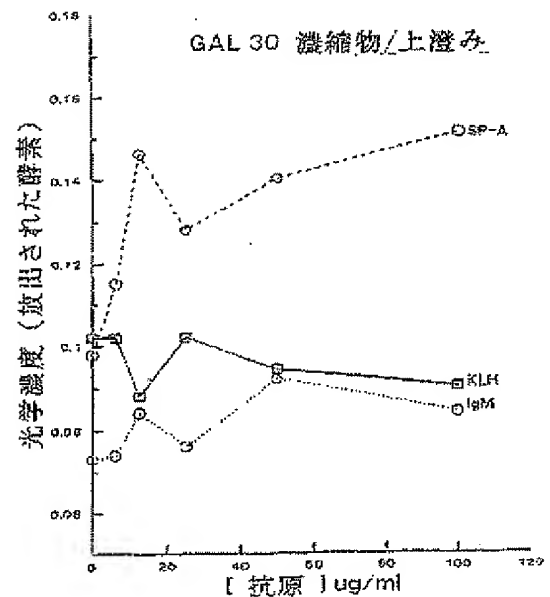
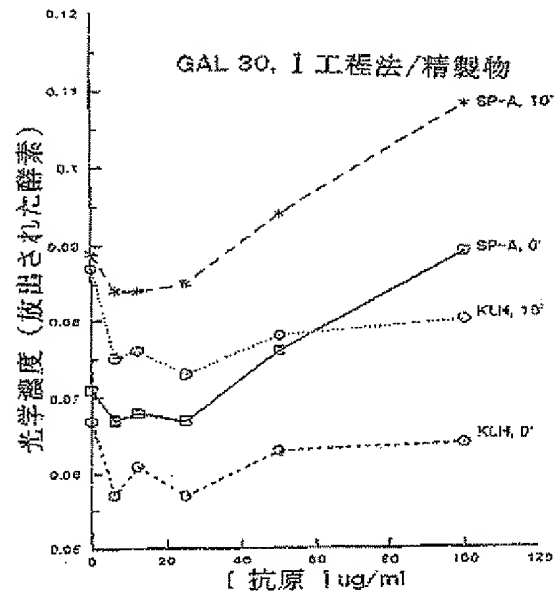
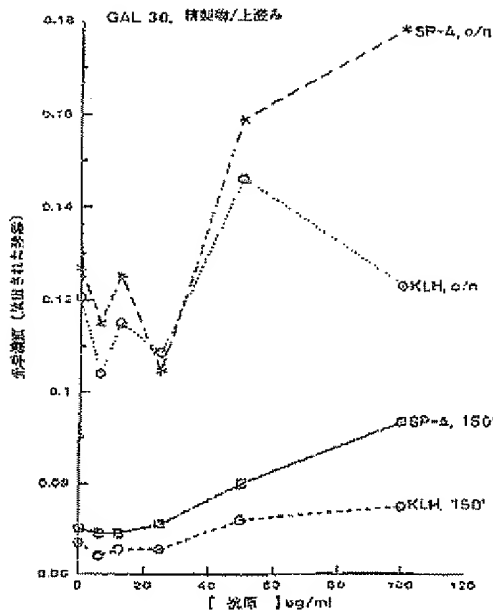


Figure 5



田 源 列 英 華 傳

PCT/CS 22/00759

[illegible]

REFUGEE DRAFTING

10. UNCLASSIFIED INFORMATION TO BE RELEASED (Continued)	WORLDWIDE RELEASE OF INFORMATION TO BE RELEASED (U.S. ONLY)	RELEASE OF INFORMATION TO BE RELEASED (U.S. ONLY)
A. EP.A.0 008 463 EE 1 DU POINT DE VUE DES RECHERCHES SUR L'EDUCATION 21 December 1992 see the whole document	***	7-24
A. JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS vol. 117, 1989, NEW YORK US pages 1 - 81 M. B. M. DE JON ET AL.: 'Production of hybridoma hybridomas based on RIT+acceptor+donor resistance' cited in the application see the whole document	***	2-74
A. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA vol. 85, October 1988, WASHINGTON US pages 7308 - 7313 R. A. SHREVE ET AL.: 'Advantages of bispecific hybridomas in one-step immunocytochemistry and immunoprecipitation' cited in the application see the whole document	***	1-54
P.A. MEX.0 139 296 474000 AMERICAN INDUSTRIES, I.D.O. 3 27 June 1981 cited in the application see the whole document	***	1-24
A. EP.A.0 020 104 470000 COMBINATIONS ET AUGUSTE 1985	***	

- 10 -